

Cloning and Expression Analysis of *F3'5'H* Gene from Mango (*Mangifera indica*)

Zhichang Zhao^{1,2*}, Aiping Gao^{1,2}, Yeyuan Chen^{1,2}, Jianfeng Huang^{1,2}, Zhiguo Dang^{1,2}, Ruixiong Luo^{1,2}

¹Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Danzhou Hainan

²National Cultivar Improvement Center of Tropical Fruit Tree, Danzhou Hainan

Email: *zhaozhichang2001@163.com

Received: Feb. 19th, 2016; accepted: Mar. 4th, 2016; published: Mar. 9th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Flavonoid-3',5'-hydroxylase (*F3'5'H*), was the key enzyme gene for synthesizing delphinidin glycosides; due to the lack of *F3'5'H*, plants cannot form a blue flower, which was also known as the "blue gene". According to the design of degenerate primers of *F3'5'H* gene sequence reported, full-length cDNA sequence of *F3'5'H* gene of mango fruit was obtained with 3'RACE and 5'RACE method. The full-length cDNA sequence of *F3'5'H* was 1598 bp, whose open reading frame of the gene was 1539 bp, encoding 512 amino acids, with the molecular weight of 57.20 KD. The 1633 bp length fragment was amplified from genome and analysis, which contained one intron, in 909 - 1003 bp. It was found that the gene encoding for the protein had close relationship with dendrobium, verbena plant through phylogenetic analysis. Expression of *F3'5'H* gene in different mango varieties showed: the high expression of the "Guifei" varieties, and the expression of green Guiqi varieties with low volume.

Keywords

Mango, Anthocyanins, *F3'5'H*, Gene Cloning

芒果*F3'5'H*基因的克隆及其表达分析

赵志常^{1,2*}, 高爱平^{1,2}, 陈业渊^{1,2}, 黄建峰^{1,2}, 党志国^{1,2}, 罗睿雄^{1,2}

¹中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点开发实验室, 海南 儋州

*通讯作者。

文章引用: 赵志常, 高爱平, 陈业渊, 黄建峰, 党志国, 罗睿雄. 芒果 *F3'5'H* 基因的克隆及其表达分析[J]. 计算生物学, 2016, 6(1): 1-7. <http://dx.doi.org/10.12677/hjcb.2016.61001>

²国家热带果树品种改良中心, 海南 儋州
Email: *zhaozhichang2001@163.com

收稿日期: 2016年2月19日; 录用日期: 2016年3月4日; 发布日期: 2016年3月9日

摘 要

黄酮-3',5'-羟化酶(flavonoid-3',5'-hydroxylase, *F3'5'H*)是合成飞燕草色素苷的关键酶基因, 缺乏 *F3'5'H*的植物不能形成蓝色花, 故又被称为“蓝色基因”。本研究根据已经报道的*F3'5'H*基因的序列设计兼并引物, 采用3'RACE和5'RACE方法, 克隆得到了一个全长cDNA序列为1598 bp的芒果果实*F3'5'H*基因。该基因开放阅读框为1539 bp, 编码512个氨基酸, 分子重量为57.20 KD。对基因组扩增得到了1633 bp长度的片段, 分析发现该基因含有一个内含子。通过系统发育分析发现该基因编码的蛋白与石斛、马鞭草等植物具有较近的亲缘关系。对不同芒果品种的*F3'5'H*基因的表达进行分析发现: 红色的贵妃品种中表达量较高, 而绿色的桂七品种中表达量较低。

关键词

芒果, 花色素苷, *F3'5'H*, 基因克隆

1. 引言

芒果是重要的热带、亚热带果树, 其果实色彩多样, 如: 绿色、黄色、浅黄色、红色、橙红色等。芒果果实富含类胡萝卜素和花色素苷等物质, 其中花色素苷合成途径是红色芒果果实着色的一个主要的代谢途径。类黄酮 3',5'羟化酶(*F3'5'H*)属于细胞色素 P450 酶家族[1] [2], 是类黄酮代谢途径中合成飞燕草色素苷及其衍生物的关键酶, 它催化黄烷酮、圣草酚、二氢槲皮素和二氢埃非醇形成二氢杨梅素色素, 为蓝色色素前体物质[3] [4]。缺乏 *F3'5'H*的植物, 如郁金香、玫瑰和香石竹等, 不能形成蓝色花, 因而 *F3'5'H* 又被称为“蓝色基因” [5]-[7]。

到目前为止, 已经在矮牵牛、鹤望兰、香石竹、茄子、龙胆、荞麦、和洋桔梗、棉花等植物中克隆到 *F3'5'H* 基因[7]-[12]。很多研究结果表明, *F3'5'H* 是花色素苷合成的关键基因, 与花蓝色形成密切相关。黄敏玲等[9]在鹤望兰的半定量分析发现, 该基因在蓝色花瓣中表达量最高, 在黄色花萼中几乎没有什么表达。芒果果实的 *F3'5'H* 基因的研究工作未见报道, 本研究采用 RACE 方法从芒果的果实中克隆得到了一个 *F3'5'H* 基因, 希望深入探讨该基因在芒果果实花色素苷合成的作用机理及其对果实着色的影响, 借以深入揭示该基因在芒果果实花色素苷生物合成的分子机理, 能为芒果果实着色提供一定的理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

以“贵妃”芒果果实为试材, 取自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所的农业部芒果种质资源圃。大肠杆菌 DH5a 为本实验保存, 引物合成自英俊生物工程技术有限公司、其它药品如: DEPC、IPTG、dNTP、X-Gal、Tryptone、Yeast extract、Amp、*Taq* DNA 聚合酶、*T₄* DNA 连接酶、各种限制性内切酶和 pMD-19T 载体均购置于大连宝生物公司。

2.2. 实验方法

1) 芒果 DNA 提取参照王家保[13]等所述的方法提取, 用无菌的双蒸水溶解, 核酸蛋白测定仪进行测

定, 并 -20°C 保存备用。

2) 芒果总 RNA 提取采用天根生化科技有限公司生产的总 RNA 提取试剂盒提取, 用 RNase-free 无菌水溶解, 用大连宝生物公司的 DNase 试剂盒进行 DNA 去除, 用核酸蛋白测定仪对所得 RNA 的 OD_{260/230}、OD_{260/280} 及浓度进行测定, 用 TaKaRa 公司的 3'和 5'-RACE 试剂盒进行目的基因的 3'和 5'的扩增。

3) PCR 反应程序为: 94°C 预变性 4 min, 95°C 变性 50 s, 50°C 复性 50 s, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72°C 延伸 7 min; 反应体系为 25 μL , 其中含 $10\times$ PCR buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL 、25 ng DNA 模板、20 μmol 引物、1.0 U *Taq* DNA 聚合酶、5.0 mmol dNTPs; 扩增反应结束后取 10 μl 进行扩增产物的电泳, 采用 gelred 染色后在紫外凝胶成像仪上观察、拍照分析。

2.3. *F3'5'H* 基因全长 cDNA 和基因组 DNA 序列的获得

以“贵妃”芒果的果实总 RNA 作为模板, 采用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 反转录合成第一链 cDNA, 并参照该试剂盒的说明书进行 cDNA 3'端和 5'末端 cDNA 的扩增。根据已知的片段和得到的 cDNA 3'端和 5'末端的序列结果拼接该基因的全长 cDNA。以上述 cDNA 和提取的基因组 DNA 为模板, 设计特异引物, 进行全长 cDNA 和基因组 DNA 序列的扩增。

2.4. *F3'5'H* 基因氨基酸序列的结构特征和分子进化的分析

将所扩增得到的全长得序列进行 NCBI 序列比对, 确定该基因是否为 *F3'5'H* 基因。采用 DNAMAN 软件分析基因核苷酸和氨基酸的结构特征和同源性, 进行其他物种 *F3'5'H* 基因的比对。分析该基因所推定氨基酸序列进行多序列比较, 同时构建系统树。

2.5. 表达分析

对不同芒果品种的 RNA, 反转录为 cDNA 并采用 primer 5.0 设计引物进行 RT-PCR 的扩增。RT-PCR 分析采用的内参引物序列为: *actin-F* 5'AATGGAAGTGGGAATGGTCAAGGC'3, *actin-R5* TGCCAGATC TTCTCCATGTCATCCCA'3; 目的基因扩增采用的引物为 *F3'5'H-F*, 5'GCACTCCAGATATACATAGC CC'3, *F3'5'H-R* 5'ACTATCCGATATAGAGCAATGAA'3, PCR 产物在 1.0%的琼脂糖凝胶上进行电泳, 并采用 Quantity One 软件进行数据分析, 做出相对表达量。

3. 结果与分析

3.1. *F3'5'H* 基因的获得

根据得到的 3'端和 5'端序列信息进行拼接, 最后的到了 *F3'5'H* 基因的全长 cDNA 序列。设计特异引物进行全长 cDNA 和基因组 DNA 序列的进行扩增, 电泳结果如图 1 所示。将电泳条带回收测序后的到了 *F3'5'H* 基因全长序列 cDNA 为 1598 bp, 分析发现开放阅读框为 1539 bp, 编码 512 个氨基酸序列(如图 2 所示)。通过 NCBI 上已经登录的柿子、番茄、葡萄的 *F3'5'H* 蛋白序列进行了比对(如图 3 所示), 发现克隆的基因为芒果 *F3'5'H* 基因。对基因组 DNA 扩增得到了大约 1633 bp 的片段, 通过与 cDNA 序列比对发现该基因含有一个内含子, 分别位于 909~1003 bp 之间(如图 4 所示)。

3.2. 芒果 *F3'5'H* 基因的部分生物信息学分析

采用 DNAMAN 进行二级结构的预测, 发现芒果 *F3'5'H* 蛋白的二级结果主要以蛋白二级结构元件以不规则卷曲和 β -折叠为主, 也具有少量的 α -螺旋结构(如图 5 所示)。采用 bioedit 软件的 Kyte 和 Doolittle 算法对 *F3'5'H* 蛋白的亲水/疏水性(正值表示疏水性, 负值表示亲水性)进行了分析, *F3'5'H* 蛋白所含的氨

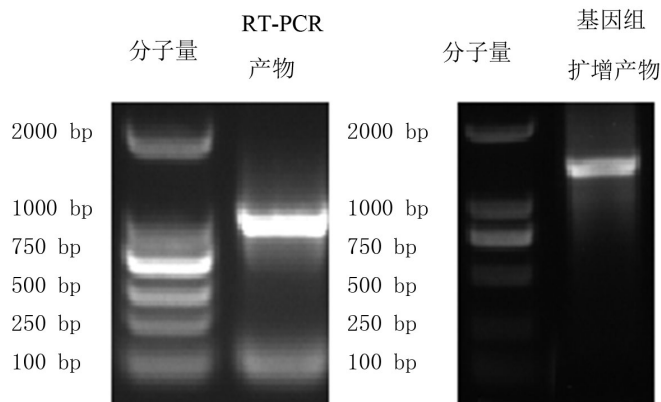


Figure 1. Electrophoresis results of cDNA and DNA of *F3'5'H*
图 1. *F3'5'H* 基因 cDNA 与基因组 DNA 电泳结果(左边为 cDNA; 右边为 DNA)

```

1   MALSAIFQDS FSLKKGLVAV LVFIITRYVW RCLFGKSRPP LPPGPGWGFPI VGALPLIGSK
61  PHVSFAKMAK KYGPIMYLKF GSLDMVVAST PEAAKAFLKT HDLNFSSRPI DTSVHHFAVD
121 GQDMVNAEYG PRWTLRQVC NTHMFGSKAL EDMAHIRVSE VGLMLQDMLK ASRKGEPLVM
181 PTHLSYLTAN VIGQVLSRR VFASNSSES EFKVLVVEEM KYAAVLLVKD IIPALGLLEG
241 GTEKKMRELH IQVDAMITKM IAEHIATSQE RKGRPDLLDV ILTYRDKPDG ERLSTENIKG
301 LLLNLFVAGT DASSAVEUA LTELKPTI FKKAQEEMDQ VIGRGRLEE SDIPKLPYLQ
361 AICKETLRKH PSTPLNLPRL ASEDVVNGY FIPKNTRLQV NIYAIGRDPD VVENPLEFTP
421 ERFLTEKNKK IDPRGDFEL IPFGAGRRIC AGVRMGWVQV EYVLGSLIHA FDWKLPEGVK
481 ELDMEEIFGL TLHKAVPLTA MVS PRLAPHA YV
    
```

Figure 2. Amino acid sequence of *F3'5'H* gene
图 2. *F3'5'H* 基因翻译成的蛋白序列

柿子	GFGS.....VAA TLLFF TRLFISAFSKPFRKH.....	R W VI	L DM	Q L L K	F H L	TCNV	S DV R	85
番茄	ALRIN.....ELFV AIITYI VHIISKLITTVRERGRRLP	T W VI	L SM	AL M K	I Y V	TCGM	T NA K	92
芒果	ALSAIFQDSFSLKKGLV VLVFI TRYVVRCLFGKSRPP.....	W F IV	I SK	SF M K	I Y F	S LDM	T EA K	95
葡萄	AIDTSLLL.....ELAA TLLFF TRFFIRSLLLKSSRK.....	K W LV	L NM	AL M R	V F M	TNSM	T GA R	90
Consensus	a i	lpppg g p	galpl g	phv	ak ak	ygp m lk g	vvas p a	
柿子	L T N IHAGPHTL DA L F E PK R LS DL L RR DD SHV VV L H SREICRL GRG P ALPDM SHAMV MM							185
番茄	L I N PNAGATHL NA M F P PR K LS NL L GK EN ANV AN L H LKSMFDA QDG C VIADV TFAMA MI							192
芒果	H L S IDTSVHHF DG M N E PR T VC NT F SK ED AHI VS V L LQDMLKA RKG P IMPIM SYLTA VI							195
葡萄	L I N PNAGATLL HA M F D AR K LS NL L GK ED SQV AV L H LRAMELE QRA P VVPEM TFSMA MI							190
Consensus	flkt d nfs rp	ay qd v a yg w llrk	hm g al w	r eg m	s e v	l n	gqv	
柿子	I K PDKGS S KDM L TT GYFNIG F SIAWMDLQ IERG KR KKF VLL IE TESAHK QAK F TLLIASRESS S. S							284
番茄	M K VEKGV V KNM L TV GYFNIG F KLAWMDIQ IEKG KN KKF DLL FD EATSNE KEN F VVMANRDNSE ER S							292
芒果	V R ASNSS S KVL M KY AVLLVK I ALGLLEG. TEKK RE IQV AMI IA IATSQE KGR L VILTYRDKPD ER S							294
葡萄	I R ETKGS S RDM L TT GYFNIG F SIAWLDIQ IQRG KH RKF RLL ME TASAHE KGN F VIMANQENST EK T							290
Consensus	ss rvf	e nef vve m a d ip	g m lh d	tkm eh	r pd ld	g l		
柿子	MI V A T T AI A A MINK S L RSHE R RD E I K Q A AF VSNKA E N Y							384
番茄	TT I A T T VI A A MMKN K F KAQQ Q KN I I N R C TF VSSEP T D Y							392
芒果	TE I G V A AV A T LLKK T F KAQE Q RG E I K Q C TL LASED V N F							394
葡萄	IT I A T T VI S A MLKN S L RAHE Q RS V L K Q C SF VSTQA E N Y							390
Consensus	sn k lllnlf agtd sss ew le	p i k	end vig rrl esd p lpyl ai ke	rkhpstplnlpr	c v gy ipk			
柿子	M W S N L I SPDKQ MEA S V I M I T V S L DG VVKLN D T A Q							484
番茄	S W D N L T SGKNA IEP A T I V I T V S L NNVIDIN E S A Q							492
芒果	Q Y D N L T TEKNK IDP A V M Q V S I A L EGVKELD E I T H							494
葡萄	S W D S E R SGRNE IDP A T I L I T V S M DG.VEIN D A A Q							489
Consensus	srll vni aigrdp vwe p ef perfl	k rgndfelipfg grricag rm g v vey lg l h fdwk p	m e fgl l k					
柿子	S P S AT SPAA V							502
番茄	A P E VT SLDV R							510
芒果	A P T VS APHA V							512
葡萄	A S S VT HQSA A							507
Consensus	l am prl y							

Figure 3. Sequence alignment of several *F3'5'H* protein
图 3. 几种 *F3'5'H* 蛋白的序列比对

氨基酸主要介于+2.6~-2.5 之间(如图 6 所示), 采用 DNAMAN 软件分析发现, 芒果 *F3'5'H* 蛋白与石斛、马鞭草等植物的蛋白序列聚为一类(如图 7 所示)。

3.3. *F3'5'H* 基因的 RT-PCR 分析

通过不同着色的芒果果皮的 RT-PCR 分析发现: 该基因在红色贵妃的果实中表达较多, 黄色果皮中次之, 而绿皮果皮中相对表达较少(图 8 所示), 初步推断 *F3'5'H* 基因可能与红色果实的花色素苷合成

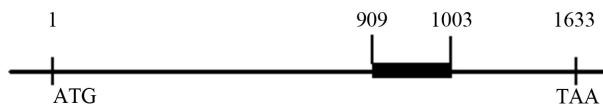


Figure 4. Structure diagram of *F3'5'H* gene

图 4. *F3'5'H* 基因组的结构图(黑框为内含子序列)

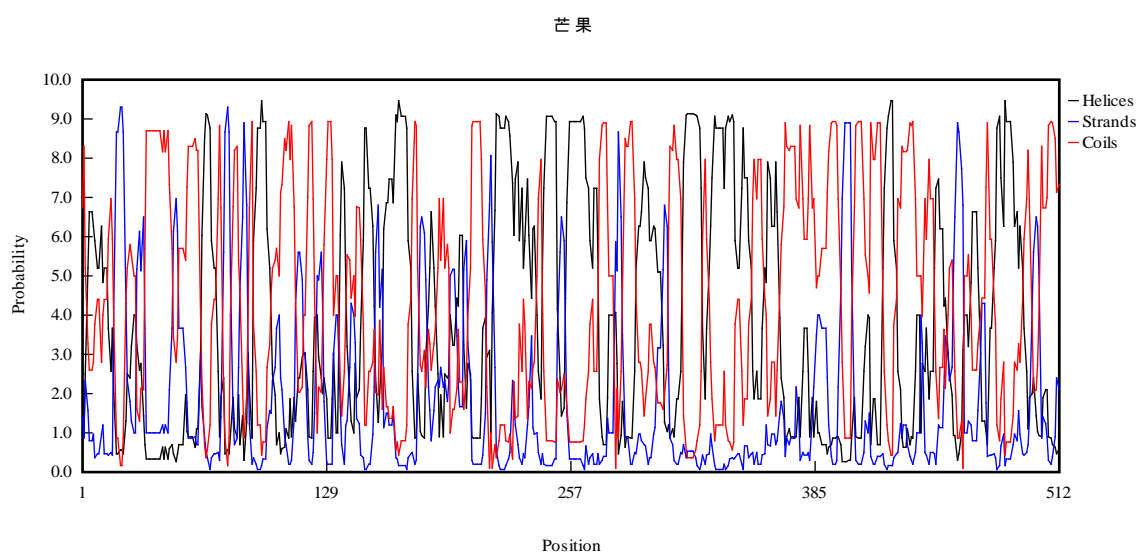


Figure 5. The prediction result of two structure of *F3'5'H* protein

图 5. *F3'5'H* 蛋白的二级结构预测结果

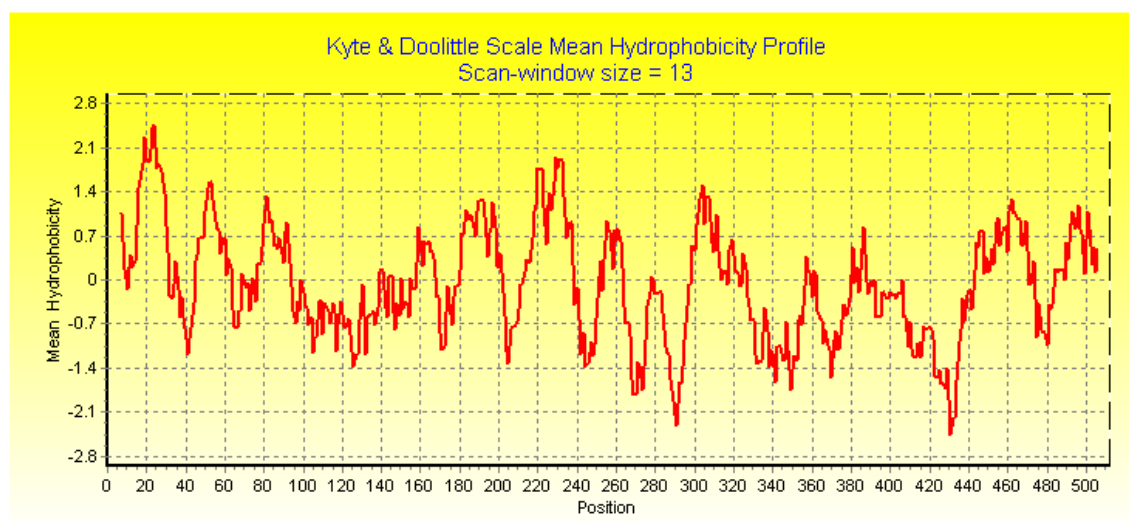


Figure 6. The hydrophobic region of *F3'5'H* protein

图 6. *F3'5'H* 蛋白疏水区的分布

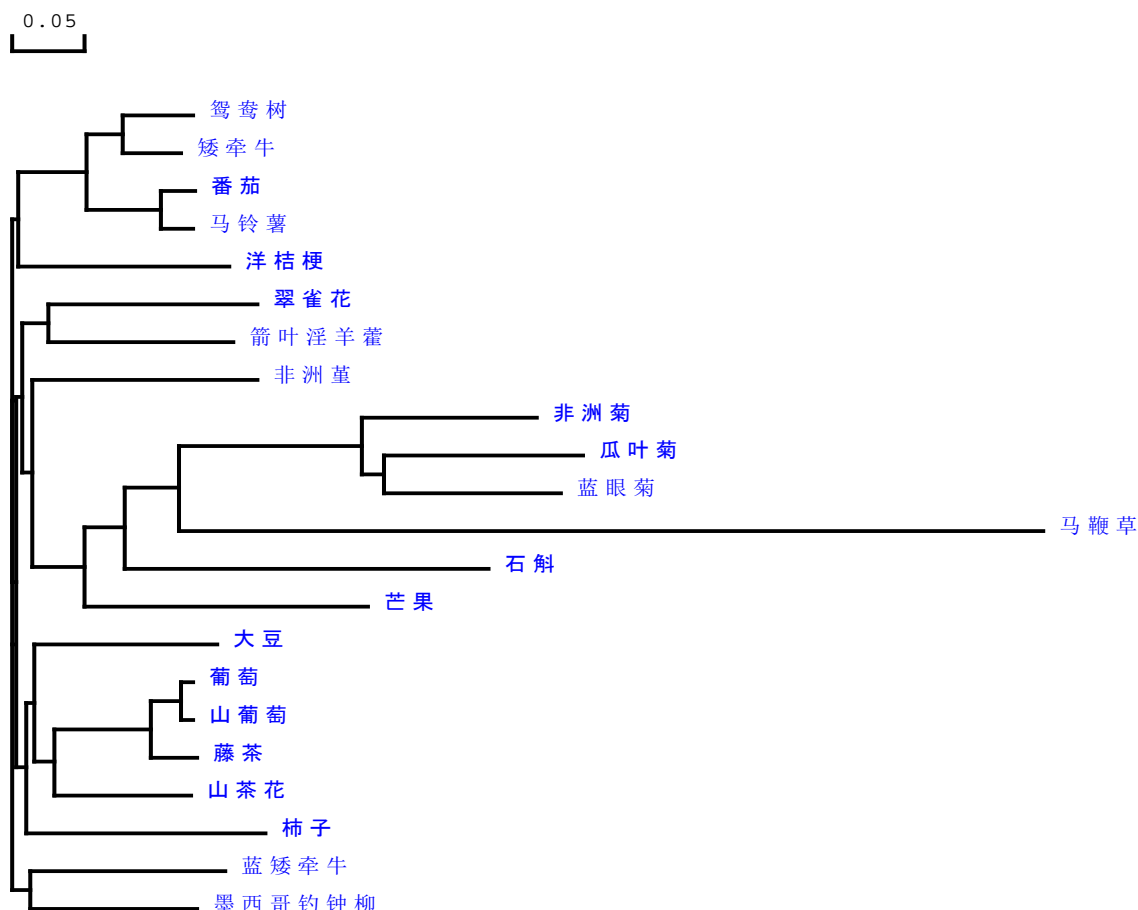


Figure 7. Phylogenetic relationship of some *F3'5'H* protein sequences

图 7. 部分基因的 *F3'5'H* 蛋白序列的系统发育关系

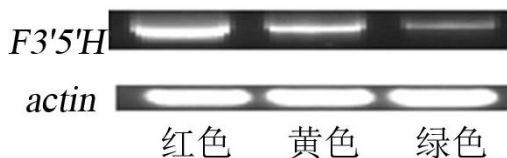


Figure 8. Expression of *F3'5'H* gene in mango fruit

图 8. *F3'5'H* 基因在不同颜色芒果果实中的表达

有密切的关系。

4. 讨论

本研究成功地从芒果果实中分离得到了一个全长 *F3'5'H* 基因, 该基因的 cDNA 的开放阅读框为 1539 bp, 编码 512 个氨基酸, 对基因组分析发现该基因含有一个内含子。通过软件对 cDNA 和蛋白序列分析证实了该序列是植物 *F3'5'H* 基因的一员, 其含有细胞色素 P450 家族基因的特征保守氨基酸序列: “PPGP” 和血红素区域序列 “FGAGRRICAG”。芒果 *F3'5'H* 基因与所选其他物种 *F3'5'H* 基因序列相比较发现, 无论在全长 cDNA 序列上还是其编码氨基酸序列上都具有较高的保守的结构域。同时, 通过与其他部分物种的氨基酸序列构建系统发生树发现, 芒果 *F3'5'H* 基因编码的蛋白与石斛、马鞭草等植物可以聚为一类。对不同着色品种的芒果 *F3'5'H* 基因的表达分析发现, 该基因在红色品种表达较高, 而在绿色品种表

达较低。白蓝等[10]对香石竹研究发现, *F3'5'H* 基因的表达有时间差异性, 花蕾期间表达量高, 盛花期基本不表达。李光等[11]发现棉花的 *F3'5'H* 基因在棉花各个组织器官中都有表达, 但主要在纤维中表达, 白色品种的表达量低于同时期的绿色品种的表达量。*F3'5'H* 基因在大多数植物中已经被克隆, 并且通过转基因技术转入不含或含量很少 *F3'5'H* 基因的模式植物中, 发现转化株比野生型能积累更多的飞燕草色素[14]。引入外源 *F3'5'H* 基因来改变植物花色, 已在多种植物上获得成功[15]。芒果 *F3'5'H* 基因是芒果花色素苷合成代谢途径中的一个关键的基因, 其对芒果果皮红色的形成具有重要的作用, 而其对芒果果实着色的功能深入研究需要进一步的转基因植物表达的验证

基金项目

国家自然科学基金资助项目(31471850), 农业部热带作物种质资源保护(15RZZY-07), 948 项目(2011-G13), 非营利性科研机构改革启动经费(CATAS, PZS-201225), (CATAS-TCGRI, 1630032013003)。

参考文献 (References)

- [1] Shimada, Y., Nakano, S.K., Ohbayashi, M., *et al.* (1999) Expression of Chimeric P450 Genes Encoding Flavonoid-3', 5'-Hydroxylase in Transgenic Tobacco and Petunia Plants. *FEBS Letters*, **461**, 241-245. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01425-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01425-8)
- [2] 赵剑, 杨文杰, 朱蔚华. 细胞色素 P450 与植物的次生代谢[J]. 生命科学, 1999, 11(3): 127-131.
- [3] Mori, S., Kobayashi, H., Hoshi, Y., *et al.* (2004) Heterologous Expression of the Flavonoid-3',5'-hydroxylase Gene of Vinca Major Alters Flower Color in Transgenic Petunia Hybrid. *Plant Cell Reports*, **22**, 415-421. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-003-0709-3>
- [4] 孟丽, 戴思兰. *F3'5'H* 基因与蓝色花的形成[J]. 分子植物育种, 2004, 2(3): 413-420.
- [5] Tanaka, Y., Sasaki, N. and Ohmiya, A. (2008) Biosynthesis of Plant Pigments: Anthocyanins, Betalains and Carotenoids. *The Plant Journal*, **54**, 733-749. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x>
- [6] Tanaka, Y., Bruglira, F., Kalc, G., *et al.* (2010) Flower Color Modification by Engineering of the Flavonoid Biosynthetic Pathway: Practical Perspectives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**, 1760-1769. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.100358>
- [7] 徐清燊, 戴思兰. 蓝色花卉分子育种[J]. 分子植物育种, 2004, 2(1): 93-99.
- [8] Toguri, T., Umemoto, N., Kobayashi, O., *et al.* (1993) Activation of Anthocyanin Synthesis Genes by White Light in Eggplant Hypocotyls Tissues, and Identification of an Inducible P-450 cDNA. *Plant Molecular Biology*, **23**, 933-946. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00021810>
- [9] 黄敏玲, 樊荣辉. 鹤望兰类黄酮 3',5'-羟化酶基因 *SrF3'5'H* 的克隆及表达分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(11): 1117-1122.
- [10] 白蓝, 贾军伟, 孙建萍, 等. 转基因香石竹中 *F3'5'H* 基因的克隆、表达和免疫学鉴定[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(2): 108-112.
- [11] 李光, 余霜, 陈庆富. 金荞麦 *F3'5'H* 基因的生物信息学分析[J]. 种子, 2014, 33(12): 6-10.
- [12] 田新惠, 李艳军, 张新宇, 等. 绿色棉纤维类黄酮 3',5'-羟化酶基因 *GhF3'5'H* 的克隆及实时定量表达分析[J]. 棉花学报, 2010, 22(5): 403-408.
- [13] 王家保, 王令霞, 刘志媛, 等. 芒果 DNA 提取方法比较及 ISSR 反应体系的优化[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 37-41.
- [14] Mellway, R.D., Tran, L.T., Prouse, M.B., *et al.* (2009) The Wound Pathogen, and Ultraviolet B-Responsive MYB134 Gene Encodes an R2R3 MYB Transcription Factor That Regulates Proanthocyanidin Synthesis in Poplar. *Plant Physiology*, **150**, 924-941. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.139071>
- [15] Tanaka, Y., Tsuda, S. and Kusumi, T. (1998) Metabolic Engineering to Modify Flower Color. *Plant and Cell Physiology*, **39**, 1119-1126. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029312>